

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA**

JAINÉ CLÁUDIA DE CONTO

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BENZOFENONA-3 POR *Trametes* sp.

**CURITIBA
2019**

JAINE CLAUDIA DE CONTO

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE BENZOFENONA-3 POR *Trametes sp.*

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial para a aprovação na disciplina de trabalho de conclusão de curso 2, do curso superior de bacharelado em química, do departamento de química e biologia da universidade tecnológica federal do parana – UTFPR

Orientadora: Profa. Dra. Marlene Soares

Coorientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

**CURITIBA
2019**

JAINE CLAUDIA DE CONTO

Avaliação da degradação da Benzofenona-3 por *Trametes* sp.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHARELADO EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Campus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – PROF. DR. GUSTAVO COUTO Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – PROF. DR^a. GISELLE MARIA MACIEL Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientador – PROF. DR^a. MARLENE SOARES Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenador de Curso – PROF. DR. LUIZ MARCOS DE LIRA FARIA

Curitiba, 10 de julho de 2019.

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente em todas as horas, ao meu pai Jaime, minha mãe Cleide, aos meus irmãos Cristian e Douglas e suas esposas Giselle e Juliane, minha avó Maria e a toda minha família e amigos que com muito carinho e apoio, me ajudaram nesta etapa da vida.

A professora Marlene Soares, pela orientação e apoio durante este trabalho.

Aos meus amigos Bruno e Gabriel pelo incentivo e grande ajuda nas pesquisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado. A minha amiga e orientadora professora Dra. Marlene Soares, por todo apoio, ajuda e ensinamentos. A professora Lucia Regina Rocha Martins que foi minha coorientadora, por disponibilizar materiais e equipamentos necessários para a realização do trabalho. A minha família e amigos pelo apoio e auxílio nas horas difíceis. Agradeço também ao Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e aos laboratórios de Microbiologia, de Biotecnologia e de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLIEC), da UTFPR-Câmpus Curitiba, pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização das análises.

RESUMO

DE CONTO, Jaine Claudia. **Avaliação da degradação de Benzofenona por *Trametes sp.*** 55 f. Trabalho de conclusão de curso. Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Filtros solares utilizados diariamente são considerados contaminantes emergentes em corpos hídricos, acabam acumulando-se no sedimento e na biota, desencadeando efeitos ecotoxicológicos progressivos e a contaminação do sistema aquático. Considerando sua dificuldade de remoção nas estações de tratamento de esgoto, pesquisas vêm sendo realizadas a fim de encontrar métodos que promovam a degradação destes compostos. Este trabalho tem como objetivo avaliar a degradação da benzofenona-3 por *Trametes sp.* A pesquisa foi dividida em três etapas, na primeira etapa foi realizado a variação de três fatores: tipo de inóculo, tipo de cultivo e o meio de cultivo. Neste estudo a remoção total não demonstrou diferença significativa com a variação das condições, levando em consideração que o meio completo é mais rico em nutrientes e que este demonstrou maior consumo de glicose ele foi escolhido para seguir a pesquisa. Na segunda etapa, foram adicionados Tween 80 e CuSO₄ com intuito de otimizar os estudos e além do meio completo, foi utilizado um novo meio de cultivo indutor de lacase e rico em nutrientes que resultou em alta biodegradação, adsorção e remoção (97%) de BP3, nos meios com a adição de tween foram observadas maiores adsorções. Na terceira etapa a degradação foi acompanhada nas melhores condições do estudo anterior, durante 12 dias, sendo analisada a quantidade de BP3 no líquido, no micélio, açúcares redutores, e a quantificação da lacase. A remoção de BP-3 foi alta, com 93,9% já na primeira amostragem (quarto dia), neste estudo foi possível a produção de mais de oito mil unidades de lacase por litro de cultivo. Com as condições estudadas pode-se dizer que a remoção da BP3 pode ser obtida utilizando o tratamento fúngico.

Palavras-chave: Degradação de filtros solares. Contaminantes Emergentes. Lacase.

ABSTRACT

DE CONTO, Jaine Claudia. Evaluation of the degradation of Benzophenone by *Trametes* sp. Completion of course work. Bachelor of Chemistry. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2019.

Solar filters used daily are considered as emerging contaminants in water bodies, accumulate in the sediment and biota, triggering progressive ecotoxicological effects and contamination of the aquatic system. Considering its difficulty of removal in the sewage treatment stations, researches have been carried out in order to find methods that promote the degradation of these compounds. This study aims to evaluate the degradation of benzophenone-3 by *Trametes* sp. The research was divided in three stages, in the first step was carried out the variation of three factors: type of inoculum, type of cultivation and the culture medium. In this study the total removal did not show significant difference with the variation of the conditions, taking into account that the complete medium is richer in nutrients and that this one showed greater consumption of glucose it was chosen to follow the research. In the second stage, Tween 80 and CuSO₄ were added to optimize the studies and in addition to the complete medium, a new nutrient rich laccase inducing culture medium was used, which resulted in high biodegradation, adsorption and removal (97%) of BP3, in the media with the addition of tween greater adsorptions were observed. In the third stage the degradation was monitored in the best conditions of the previous study, during 12 days, being analyzed the amount of BP3 in the liquid, the mycelium, reducing sugars, and the quantification of laccase. The removal of BP-3 was high, with 93.9% in the first sampling (fourth day), in this study it was possible to produce more than eight thousand units of laccase per liter of culture. Under the conditions studied it can be said that the removal of BP3 can be obtained using fungal treatment.

Keywords: Biodegradation of sunscreens. Emerging Contaminants. Lacase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do Octocrileno (OC), filtro ultravioleta orgânico, nome e abreviação.....	17
Figura 2 - Estrutura da benzofenona-3.....	18
Figura 3 - Espectro de absorção da benzofenona-3 em UV.....	19
Figura 4 - Exemplo da estrutura da lignina.....	22
Figura 5 - <i>Trametes</i> sp.	23
Figura 6 - Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.....	25
Figura 7- Inóculo pellet de <i>Trametes</i> sp. obtido em extrato de malte 2%, 28°C, 135 rpm, após 3 dias.....	27
Figura 8 - Inóculos pellet em meio salino.	28
Figura 9 – Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de 0,5 a 4 mg·L ⁻¹ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287$ nm).	32
Figura 10 - Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de 1 a 12 mg·L ⁻¹ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287$ nm).	33
Figura 11 – Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de 10 a 16 mg·L ⁻¹ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287$ nm).	33
Figura 12 - Reta de calibração da BP3 em CLAE	34
Figura 13 - Curva padrão da Glicose pela técnica de DNS.....	36
Figura 14 - Relação da remoção de benzofenona-3 por adsorção e biodegradação.	43
Figura 15 - Gráfico correlacionando a remoção de BP3 (%) com consumo de glicose (g·l ⁻¹).	44
Figura 16 – Gráficos correlacionando a remoção de BP3 com a produção de lacase.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo completo.....	29
Tabela 2 - Composição de macronutrientes e micronutrientes.....	29
Tabela 3 - Remoção da benzofenona-3 por <i>Trametes</i> sp. após 7 dias, em 28°C com concentração inicial de filtro solar de 10 mg·L ⁻¹ (n=3).....	38
Tabela 4 - Resultado do consumo de glicose em 7 dias por <i>Trametes</i> sp. (n=2)	39
Tabela 5 - Remoção da benzofenona-3 com <i>Trametes</i> sp. após 12 dias, em 28°C com concentração inicial de filtro solar de 15 mg·L ⁻¹ . (n=2).....	40
Tabela 6 - Resultado do consumo de glicose em 12 dias por <i>Trametes</i> sp. no estudo 2. (n=2).....	42

LISTAS DE ABREVIATURA, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABD	Agar Batata Dextrose
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BP	Benzofenona
BP-1	Benzofenona-1
BP-3	Benzofenona-3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
4-HB	Ácido 4-hidroxibenzoico
4-DHB	Ácido 4 - dihidroxibenzóico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LIP	Lignina Peroxidase
LLIEC	Limnologia, Ecologia e Cromatografia
LAMEAA	Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais
MnP	Manganês Peroxidase
OC	Octocrileno
TiO ₂	Óxido de titânio
USGS	Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
ZnO	Óxido de zinco
WRF	Fungos de podridão branca (do inglês <i>white-rot fungi</i>)
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Radiação Solar	15
3.2 Filtros UV	15
3.2.1 Filtros UV Inorgânicos	16
3.2.2 Filtros UV Orgânicos	16
3.2.2.1 <i>Benzofenona-3</i>	18
3.3 Filtros Solares como Contaminantes Emergentes	20
3.4 Degradação de Filtros UV utilizando fungos da podridão branca	21
4 METODOLOGIA	25
4.1 Microrganismo	25
4.1.1 Manutenção e repique das cepas	26
4.1.2 Preparo do inóculo	26
4.1.2.1 <i>Inóculo pellet</i>	26
4.1.2.2 <i>Inóculo plugue</i>	28
4.2 <i>Benzofenona-3</i>	28
4.3 Estudo 1 – Degradação de <i>benzofenona-3</i> por <i>Trametes sp</i>	29
4.4 Estudo 2 – Otimização da degradação da <i>BP-3</i>	30
4.5 Estudo 3 – Acompanhamento da cinética de biodegradação da <i>BP-3</i>	31
4.6 Análises	31
4.6.1 Quantificação da <i>BP-3</i> no meio	32
4.6.1.1 <i>Espectrofotometria</i>	32
4.6.1.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	34
4.6.2 Quantificação da <i>BP-3</i> adsorvida no micélio	34
4.6.3 Determinação de açúcares redutores	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Estudo 1 – Degradação de <i>benzofenona-3</i> por <i>Trametes sp</i>	38
5.1.1 Quantificação do consumo de glicose	39
5.2 Estudo 2 – Otimização da biodegradação da <i>BP-3</i>	39
5.2.1 Quantificações do consumo de glicose pelos fungos	41
5.3 Estudo 3 – Acompanhamento da cinética de biodegradação da <i>BP-3</i>	42
6 CONCLUSÃO	46
8 SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTUROS	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A intensidade da radiação ultravioleta (UV) pode causar diversos efeitos nocivos à saúde humana (CHISVERT; SALVADOR, 2007). Devido a isso houve um grande aumento na utilização de fotoprotetores, sendo estes aplicados em uma variedade de produtos de cuidados pessoais, como cremes hidratantes, maquiagens, entre outros, com a finalidade de evitar ou diminuir os efeitos nocivos do sol nos seres humanos (CHISVERT; SALVADOR, 2007; POMPEI, 2016).

De acordo com a natureza dos filtros UV é possível classificá-los como inorgânicos (físicos), que refletem a radiação UV espalhando-a, e orgânicos (químicos), que a absorvem (CHISVERT; SALVADOR, 2007). A benzofenona (BP), por exemplo, é um filtro orgânico, que age protegendo a pele da radiação UVB e/ou UVA, além de apresentar grande estabilidade química (SANAD et al., 2010; CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2011).

Os filtros UV atingem os corpos hídricos através de lançamentos clandestinos de esgoto, de atividades recreacionais e da ineficiência observada na sua eliminação/retenção em estações de tratamento de efluentes (GAGOFERRERO et al., 2012). Fotoprotetores possuem como característica alta lipofilicidade e baixa biodegradabilidade, devido a isso se acumulam nos lodos dos esgotos durante o tratamento de águas residuárias e na biota em concentração de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ a $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (BADIA-FABREGAT et al., 2017).

Dados confirmam que no ambiente marinho estes compostos são persistentes e de ampla dispersão (SÁNCHEZ, 2015). Eles são responsáveis por contaminar não só a água, mas também os organismos aquáticos, como mexilhões, crustáceos, peixes, mamíferos e aves. Em tecidos de peixes eles podem induzir mudanças nos genes através de hormônios, causando efeitos adversos sobre a fecundidade e a reprodução, gerando bioacumulação que desencadeia efeitos ecotoxicológicos (SÁNCHEZ, 2015). O acúmulo dessas substâncias nos tecidos musculares e adiposos dos organismos ocorre devido à sua lipofilicidade (GAGOFERRERO et al., 2012).

Resíduos de filtros UV orgânicos mais polares foram encontrados em todos os tipos de matrizes de água, incluindo a água da torneira (BADIA-FABREGAT et al., 2017). No estudo realizado por LI e colaboradores (2007) em estação de tratamento

de águas residuárias (ETAR) as remoções obtidas foram: coagulação-floculação - 7,6 a 21%, microfiltração contínua - 3,6 a 8,2% e ozonização - 16 a 28%. Esses tratamentos físico-químicos não são eficientes na degradação da maioria dos filtros UV, logo, novos métodos precisam ser desenvolvidos (GAGO-FERREIRO et al., 2012a, BADIA - FABREGAT, 2013). Um exemplo de tratamento alternativo que pode vir a ser empregado é a utilização de basidiomicetos ou os fungos da podridão-branca da madeira (*white rot fungi* - WRF) (GAGO-FERREIRO et al., 2012a; BADIA-FABREGAT et al., 2012; BADIA-FABREGAT, 2013; BADIA-FABREGAT et al., 2014).

Atualmente poucos trabalhos abordam o tema de biodegradação dos filtros UV, tanto em meio líquido quanto em meio sólido (BADIA-FABREGAT et al., 2017). Foi realizado um estudo da avaliação do potencial do fungo *Trametes versicolor* para degradar filtros UV selecionados. Os resultados obtidos da degradação dos filtros UV nesse estudo por *Trametes versicolor* são mostrados em Rodriguez-Rodriguez e colaboradores (2012).

Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a biodegradação de Benzofenona-3 (BP-3) utilizando *Trametes* sp. variando o tipo de inoculo (pellet ou plug), o tipo de cultivo (estático ou agitado) e o meio de cultivo (mais completo, mais simples ou um meio indutor de lacase), verificando através de análises espectrofotométricas e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), qual destes é o mais eficiente na degradação do fotoprotetor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a biodegradação de benzofenona-3 por *Trametes* sp. em escala laboratorial.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a degradação da benzofenona-3 por *Trametes* sp. variando o tipo de inóculo (pellet ou plug), tipo do cultivo (estático e agitado) e a composição de meio de cultivo;

Otimizar a degradação da BP-3 por *Trametes* sp. adicionando tensoativo (tween 80), e/ou sulfato de cobre e um meio de cultivo mais complexo;

Acompanhar a cinética da degradação da BP-3 na melhor condição resultante dos estudos, durante doze dias, analisando açúcares redutores, lacase e a remoção da Benzofenona-3 do meio de cultivo (por biodegradação e adsorção no micélio).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Radiação Solar

A radiação solar é composta por um espectro contínuo de radiação eletromagnética que apresenta divisão e denominação em concordância com o intervalo de comprimento de onda (λ): radiação ultravioleta (UV) (100-400nm), visível (400-780nm) e infravermelho (> 780 nm) (BALOGH et al., 2011).

Quando atinge com ação cumulativa a pele desprotegida a radiação (UV) provoca um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas. Várias moléculas da pele podem absorver a radiação UV e sofrer alterações químicas por consequência dessa absorção. O Ácido desoxirribonucleico (DNA), por exemplo, absorve a radiação UV e, portanto, pode sofrer mutações que, em seguida, podem resultar em transformações malignas da célula. A radiação UV pode ativar componentes do sistema imune cutâneo, gerando resposta inflamatória por distintos mecanismos (BALOGH et al., 2011).

Diante dos os efeitos danosos da radiação UV sobre o material genético, que podem ser causados quando existe excesso de exposição solar, o uso de fotoprotetores é fundamental. A epiderme e a derme sofrem alterações químicas e histológicas após exposição solar persistente (BALOGH et al., 2011).

Se a exposição à radiação UV for regular ela apresenta efeitos benéficos para a saúde através do estímulo de produção da vitamina D3 (colecalfiferol). (BALOGH et al., 2011; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

3.2 Filtros UV

Filtros UV são substâncias usadas para absorver a radiação solar. São divididos em dois grupos: os inorgânicos (também conhecido como físicos), cuja ação ocorre pela reflexão e dispersão dos raios UV, e os orgânicos (químicos),

responsáveis pela absorção da radiação UV (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2009; FENT; ZENKER; RAPP, 2010).

3.2.1 Filtros UV Inorgânicos

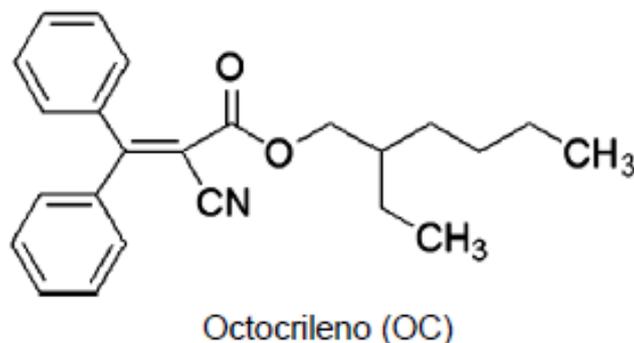
Os filtros solares inorgânicos são representados por micropartículas minerais de óxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO). Estes dois óxidos são materiais semicondutores e os mecanismos de absorção e de desativação da luz UV envolvem transições entre bandas de valência e de condução do sólido (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Este tipo de filtro solar deixa uma película branca sobre a pele sendo esteticamente desagradável; entretanto, ele apresenta grande eficácia de proteção da pele, sendo recomendado para uso infantil e de peles sensíveis (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

3.2.2 Filtros UV Orgânicos

Os filtros UV denominados químicos, ou orgânicos, são formados por anéis benzênicos conjugados com grupos carboxílicos contendo pelo menos dois grupos substituintes nas posições *orto* ou *para*, sendo um grupo doador de elétrons e o outro um elétron-atrator. Uma característica destes filtros é a inserção de cadeias alquílicas para contribuir na lipofilia molecular. Dessa maneira ocorre o aumento de adesão da substância na pele, evitando que ela seja retirada quando estiver em contato com a água (DÍAZCRUZ; BARCELO, 2009; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014). Na figura 1 é ilustrado um exemplo da estrutura molecular destes compostos.

Figura 1- Estrutura molecular do Octocrileno (OC), filtro ultravioleta orgânico, nome e abreviação



Fonte: GAGO-FERREIRO; DIAS-CRUZ; BARCELO, 2015.

Os filtros ultravioletas orgânicos agem absorvendo a radiação solar de alta energia, transformando-a em ondas eletromagnéticas da região do VIS ou IV, radiações de menor energia (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

De acordo com Nascimento, Santos e Aguiar (2014, p. 201):

Os fotoprotetores orgânicos UV ideais devem preconizar diversas características. São elas: (a) estabilidade a luz, ao calor e a água; (b) não deve ser tóxico, irritante, mutagênico ou teratogênico, com ou sem a ação da luz; (c) absorver UV em amplo espectro (UVA e UVB); (d) possuir um coeficiente de extinção específica (E1%, 1cm) acima de 1.000 para se ter o máximo de proteção com o mínimo emprego de filtro UV; (e) apresentar um peso molecular superior a 500 Dalton (D) para se prevenir a permeação cutânea; (f) possuir um log P (coeficiente de partição entre água e octanol) superior a 5, ou seja, deve possuir uma lipofilia específica para uma boa adesão a pele, sem que ocorra a sua retirada pela ação da água e evitando também a permeabilidade cutânea por afinidade ao tecido córneo e (g) não deve apresentar sinergia com outros componentes da formulação de um filtro solar, ou mesmo com a embalagem de acondicionamento do produto acabado.

Afim de se obter moléculas mais ativas é uma prática comum a derivatização de fotoprotetores mais antigos, como a benzofenona que pode ser sintetizada via reações de alquilação de Friedel-Crafts entre benzeno e tetracloreto de carbono, na presença de cloreto de alumínio (AlCl₃), com posterior hidratação (NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

A benzofenona fornece fotoproteção UVB e UVA, no entanto, seu uso é proibido por causar irritação dérmica e ocular, isso exigiu a derivação desta molécula

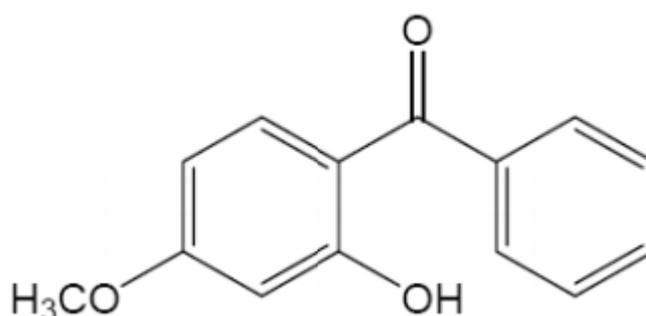
(NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014). Com a inserção de variados grupos cromóforos a essas novas moléculas, foram observados efeitos positivos, tais como a perda do poder irritante a pele e aos olhos (NASCIMENTO; SANTOS; AGUIAR, 2014).

Entre a família de benzofenonas, a benzofenona-3 é o composto mais amplamente utilizado para a prevenção da fotodegradação (KIM et al., 2016).

3.2.2.1 Benzofenona-3

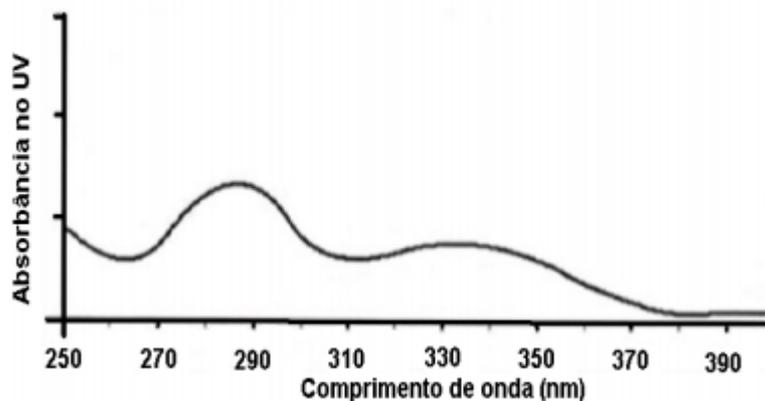
A benzofenona-3 também conhecida como oxibenzona, difenilcetona ou estruturalmente 2-hidroxi-4- metoxibenzofenona, de formula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, possui principal aplicação tópica como filtro solar químico e absorve radiação no intervalo de comprimento de onda de 270 a 400 nm, é um composto lipofílico, de cor amarelo claro, com massa molar de $228 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ROGGIA et al., 2014;PAESE, 2008). A BP-3 é fotolábil, facilmente oxidada e pode ser obtida pela reação entre o 2-hidroxianisol e cloreto de benzoíla (SANTOS, 2007). Sua estrutura é apresentada na figura 2:

Figura 2 - Estrutura da benzofenona-3.



Fonte: ROGGIA et al., 2014

Os picos de absorção máxima em comprimentos de onda (λ) para a BP-3 são 288nm e 325nm (NETO, 2009), seu espectro de absorção está representado na figura 3.

Figura 3 - Espectro de absorção da benzofenona-3 em UV

Fonte: NASCIMENTO, 2011, p. 37

Segundo NETO (2009) a comissão europeia apresenta alguns valores de solubilidade para a benzofenona-3: Água: 0,0037 g·L (20 °C); Butanol: 10%; Glicerina: < 0,01%; Miglyol® 812: 14,0% Etanol: 6,0%; Acetona: > 20%; Isopropanol: 10,0%; Clorofórmio: > 20%.

A concentração máxima de BP-3 autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nos fotoprotetores químicos é de 10%, caso seja utilizado mais que 0,5%, deve ser incluso a informação no rótulo: contém oxibenzona (SANTOS, 2007; GUSTAVSSON-GONZALEZ; FARBROT; LARKÖ, 2002; SUZUKI et al., 2005; KIM et al., 2016).

A introdução de fotoprotetores como a benzofenona-3 no ambiente é ampla e devido às suas propriedades físico-químicas, como persistência, volatilidade, lipofilicidade, pode prejudicar o meio ambiente (MOREIRA et al., 2013; BADIA-FABREGAT et al., 2012). Quando o equilíbrio ambiental é afetado engloba a saúde humana e a qualidade de vida, que são determinados por fatores físicos, químicos, biológicos, sociais e psicossociais do ambiente (MOREIRA et al., 2013).

A benzofenona-3 pode causar sérios problemas dermatológicos e potenciais efeitos adversos à saúde, incluindo problemas na fecundidade e na fertilidade, devido ao uso generalizado pelas mulheres grávidas e crianças (FENT; KUNZ; GOMEZ, 2008).

Segundo FLOR (2007) visando solucionar o problema da penetração dos filtros orgânicos para o interior do organismo, uma nova tecnologia está sendo estudada: a utilização de esferas de silicone contendo os filtros solares. As

estruturas de silicone devem dificultar a penetração das moléculas de filtros solares na pele.

3.3 Filtros Solares como Contaminantes Emergentes

Segundo a Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (USGS), do inglês *United States Geological Survey* (2012), contaminante emergente pode ser definido como:

Uma substância química, de ocorrência natural ou antrópica, ou qualquer microrganismo que não é normalmente encontrado no ambiente, mas que tem potencial para entrar no ambiente e causar efeitos adversos ecológicos e (ou) sobre a saúde humana, sendo estes efeitos conhecidos ou suspeitos.

Como pode ser observado por esta definição, o termo emergente está ligado à grande preocupação que estas substâncias trazem e aos impactos reais e potenciais tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. A característica de contaminante emergente é de que estes não estão especificados em legislações e o conhecimento a seu respeito é escasso (MOREIRA et al., 2013).

Os filtros UV contaminam o meio ambiente de duas maneiras: indiretamente, seguindo para a estação de tratamento de efluentes, onde à baixa eficiência na remoção destes compostos tornam esta via a maior fonte destes poluentes no ambiente, ou diretamente pela remoção da pele através de banhos e atividades recreativas como natação entre outras (SILVA, 2014; BADIABREGAT, 2013; GAGO-FERRERO et al., 2012).

Fotoprotetores não apresentam tempos de meia-vida longos, mas seu constante lançamento pode lhe conferir um caráter pseudo-persistente, ou seja, a frequência com que estas substâncias são introduzidas no meio é maior do que aquela necessária para sua remoção ambiental (SILVA, 2014).

Estudos realizados em países europeus apontaram a presença de filtros UV em águas superficiais, sedimentos e peixes. A preocupação quanto à presença deste tipo de substância no ambiente e à exposição de organismos aquáticos reside

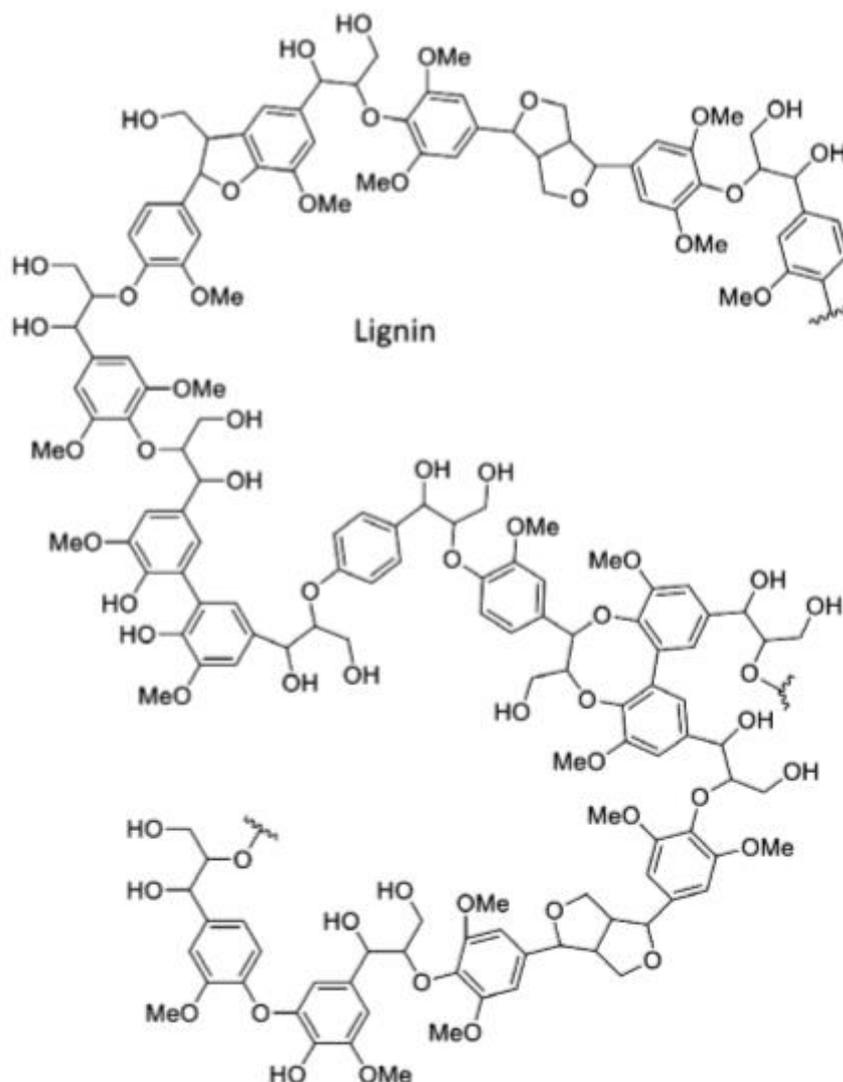
na potencialidade de bioacumulação e na capacidade de atuarem como interferentes endócrinos (SILVA, 2014).

Segundo estudos *in vitro* os filtros UV podem diminuir a ação estrogênica, afetando a fecundidade e a reprodução de peixes. Estudos *in vivo* em roedores indicam redução do peso das gônadas e produção de hormônios esteroides, sendo que, após um longo período de exposição o desenvolvimento de órgãos sexuais em ratos machos foi afetado (SCHLUMPF et al., 2004).

3.4 Degradação de Filtros UV utilizando fungos da podridão branca

Os fungos apodrecedores da madeira (fungos de podridão branca ou do inglês *white-rot fungi*-WRF) compreendem o grupo de fungos mais utilizados na biorremediação fúngica. WRF é um grupo heterólogo de fungos, compreendendo os basidiomicetos, mas também alguns ascomicetos que têm a capacidade de degradar a lignina para aproveitar a celulose e a hemicelulose presentes no seu interior. A lignocelulose compreende boa parte da biomassa da terra, no entanto a lignina é um composto difícil de degradar devido à sua composição e estrutura (figura 4), sendo bactérias e muitos fungos incapazes de metabolizá-la (FABREGAT, 2014; LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

Figura 4 - Exemplo da estrutura da lignina.



Fonte: LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012

Os fungos de podridão branca podem degradar a lignina, para isso eles desenvolveram um sistema enzimático com alta inespecificidade dada pelo mecanismo de oxidação. Este sistema é baseado na geração de radicais livres e na presença de enzimas extracelulares desde lacases e peroxidases que conferem alta tolerância a compostos tóxicos e a capacidade em transformar compostos pouco solúveis. Estas duas características principais, confere a estes fungos as características perfeitas para seu uso na degradação de xenobióticos (FABREGAT, 2014).

Sob condições aeróbicas ideais, o fungo da podridão branca chamado *Phanerochaete chrysosporium*, degrada um grama de várias ligninas isoladas por

grama de fungo (peso seco) em 48 horas, produzindo cerca de 70% de CO₂ e 30% de compostos solúveis em água de baixo peso molecular (LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

Os fungos de podridão branca, como *Trametes* sp. (Figura 5), degradam a lignina e uma ampla gama de diversos poluentes aromáticos. Essa degradação pode ser realizada por meio de radicais altamente reativos, cuja produção é catalisada por três grupos de enzimas oxidativas extracelulares, a saber, lignina peroxidases (LiP), peroxidases de manganês (MnP) e lacases (COLLINS, 1997).

Figura 5 - *Trametes* sp.



Fonte: Mycoweb
disponível em: <http://www.mykoweb.com/CAF/species/Trametes_versicolor.htm>
Acesso 01 abril.2019

A degradação da lignina consiste em peroxidases, enzimas produtoras de H₂O₂, álcool veratrílico, oxalato e manganês. Estas enzimas acoplam a redução do peróxido de hidrogênio à água com a oxidação de uma variedade de substratos, sendo as principais lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (FABREGAT, 2014; ELLOUZE; SAYADI, 2016).

Lignina peroxidase (LiP) foi descoberta em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* é uma enzima que depende de H₂O₂, possui potencial redox elevado e seu pH ideal é baixo e capaz de oxidar uma variedade de substratos incluindo polímeros (LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

Manganês peroxidase (MnP) foi descoberta em cultura do mesmo fungo é uma enzima que gera Mn³⁺, ela atua como um oxidante difuso em unidades de lignina fenólica e não-fenólica via reação de peroxidação lipídica (LEISOLA; PASTINEN; AXE, 2012).

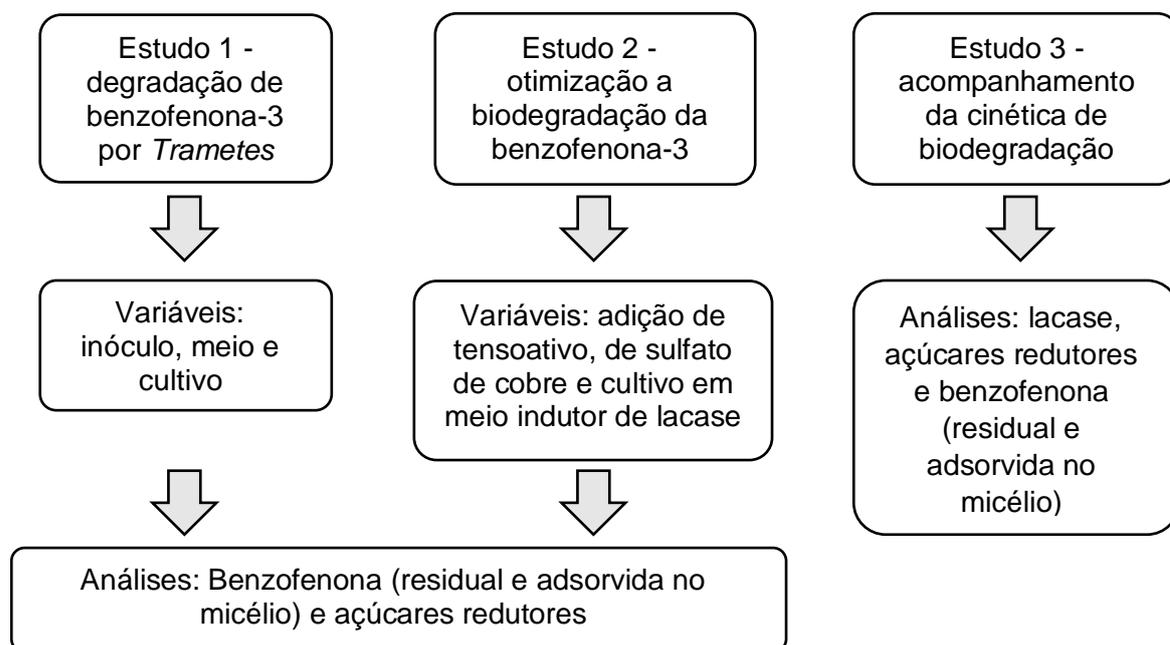
As lacases são oxidoredutases de oxigênio, elas podem catalisar a oxidação de uma ampla variedade de substratos, incluindo difenóis, aminofenóis, polifenóis, poliaminas, metoxifenóis e aril-diaminas e alguns íons inorgânicos com reduções simultâneas de O₂ e H₂O sem produção intermediária de peróxido de oxigênio (FABREGAT, 2014; MOROZOVA et al., 2007).

Em uma de suas pesquisas GAGO-FERREIRO et al. (2012a) consideraram o fungo da podridão branca *Trametes* sp. como uma alternativa promissora na degradação dos protetores solares benzofenona-3 (BP3) e benzofenona-1 (BP1), com eficiência de remoção de 99% em menos de 24 h. Os autores concluíram que a biodegradação parece ser o tratamento mais eficaz na remoção da BP-1 e BP- 3. Foram identificados produtos de degradação da BP-3, como BP-1, ácido 4 - dihidroxibenzóico (4-DHB) e ácido 4-hidroxibenzóico (4-HB), após análises não foram observadas atividades de estrogênios e os mesmos após um período foram rapidamente degradados por *Trametes* sp.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia, de Biotecnologia e de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLIEC) e no Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Curitiba, Sede Ecoville. A execução desse projeto foi dividida em três etapas, sendo (1) – Estudo da degradação de BP-3 por *Trametes* sp. (2) – Otimização da degradação da BP-3 adicionando tensoativo (tween 80), e/ou sulfato de cobre utilizando dois meios de cultivo, completo e um meio de cultivo mais complexo; (3) – Acompanhamento cinético da degradação.

Figura 6 - Esquema das etapas desenvolvidas durante a pesquisa.



4.1 Microrganismo

O fungo *Trametes* sp. (nível de Biossegurança 1) foi o utilizado nesta pesquisa, tendo sido cedido pelos Laboratórios de Microbiologia e de Biotecnologia da UTFPR. Os meios de cultivo e materiais usados nos experimentos foram autoclavados a 121°C (1,1 atm) por 15 minutos antes do uso e por 30 minutos para descarte. As inoculações e demais manipulações seguiram os procedimentos de segurança e esterilidade, comuns a laboratórios de Microbiologia e de Biotecnologia.

4.1.1 Manutenção e repique das cepas

Para manutenção das cepas e sua utilização nos experimentos, o cultivo foi realizado em placas de Petri e as cepas foram repicadas mensalmente em Agar Batata Dextrose (ABD) (recomendado pela *American Type Culture Collection* para *Trametes* sp. 20869). O fungo foi cultivado em estufa a 28°C durante sete dias, e depois armazenado (geladeira em temperatura média de 4°C) até ser realizado o repique ou a utilização no preparo do inóculo.

4.1.2 Preparo do inóculo

Foram utilizadas duas metodologias para o preparo do inóculo, uma para o inóculo pellet e outra para o plug, utilizando o fungo *Trametes* sp. cultivado por repique simples em placas de Petri (contendo meio agar batata dextrose) e inoculado em estufa a 28°C por sete dias.

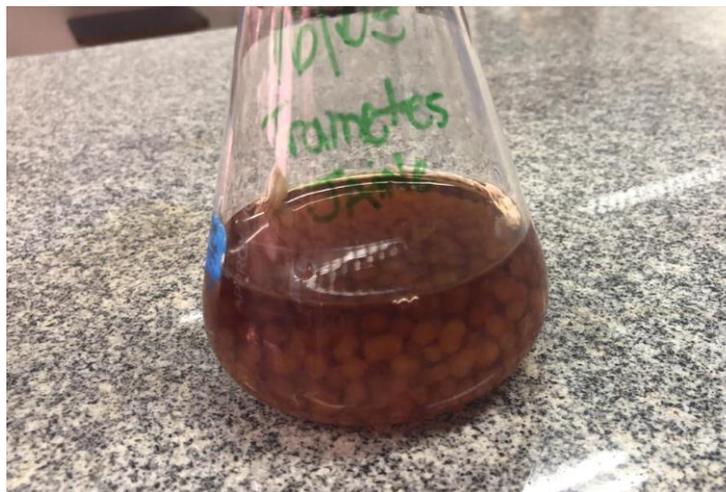
4.1.2.1 Inóculo pellet

Este inóculo foi preparado em duas etapas: a primeira envolvendo a propagação do micélio e a segunda a formação de pellets (FONT et al., 2003). A metodologia está descrita nos próximos parágrafos.

Na primeira etapa, quatro plugues de 1 cm de diâmetro foram cortados na zona de crescimento do fungo, cultivado em ágar extrato de malte a 2% (p/v) até que o crescimento atingisse a borda da placa de Petri. Esses plugues foram adicionados em 150 mL de caldo extrato de malte a 2% (p/v), em Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram incubados a 28°C em agitador orbital em 120 rotações por minutos (rpm) (raio = 25 mm). Após 4 -5 dias uma densa massa micelial era formada, sendo separada do meio com auxílio de uma pinça e desagregados com uso de ultraturrax (3 ciclos de 10 segundos).

Essa suspensão micelial desagregada foi usada para produzir pellets, na segunda etapa, inoculando em 150 mL de caldo extrato de malte a 2% (p/v), nas mesmas condições descritas na primeira fase de cultivo. Os pellets formados apresentavam 2 - 3 mm, como ilustra a Figura 6.

Figura 7- Inóculo pellet de *Trametes* sp. obtido em extrato de malte 2%, 28°C, 135 rpm, após 3 dias.



Os pellets foram separados do meio por filtração simples (retendo-os no Erlenmeyer com o auxílio de uma espátula enquanto o meio era coletado num Bequer), sendo ressuspensos em solução salina estéril (0,85% (p/v) de NaCl), numa proporção de 1:1 (v/v) (BADIA-FABREGAT, 2013). Segundo BADIA-FABREGAT (2013) esses pellets podem ser usados imediatamente ou mantidos refrigerados a 4°C por até um mês.

Figura 8 - Inóculos pellet em meio salino.



Os pellets foram adicionados nos experimentos de modo a obter uma concentração celular aproximada de 1 g peso seco L⁻¹ no estudo 1 e de 5 g peso seco L⁻¹ nos demais estudos (GAGO-FERRERA et al., 2012a; BADIA-FABREGAT et al., 2012).

4.1.2.2 Inóculo plugue

Este foi preparado cortando quatro plugues de 1 cm de diâmetro na zona de crescimento do fungo, após ser cultivado em meio agar batata dextrose, por sete dias (utilizando o micélio e o meio também).

4.2 Benzofenona-3

Para o preparo da solução estoque de benzofenona-3 (Sigma-Aldrich, ≥ 99,0%) o filtro UV foi diluído em etanol P.A. (BADIA-FABREGAT et al., 2012; GAGOFERRERO et al., 2012a), na concentração de 1 g·l⁻¹. A solução foi armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz (frasco embrulhado em papel alumínio) (BADIA-FABREGAT, 2013).

Em estudo prévio foi verificado se o etanol apresentaria inibição ao crescimento de *Trametes* sp. através da quantificação da biomassa cultivada em extrato de malte 2%. Não foi observada inibição

Em estudo prévio foi verificado se o etanol apresentaria inibição ao crescimento de *Trametes* sp. através da quantificação da biomassa cultivada em extrato de malte 2%. Não foi observada inibição.

4.3 Estudo 1 –Degradação de benzofenona-3 por *Trametes* sp.

Este estudo foi conduzido para avaliar se o tipo de inóculo (pellet ou plugue), o tipo de cultivo (estático - estufa ou agitado - 120 rpm) e o meio de cultivo (mais completo ou mais simples) interferiam na biodegradação de BP-3 por *Trametes* sp.

O meio de cultivo foi o mesmo utilizado no trabalho de BADIA FABREGAT (2013) (Tabelas 4 e 5). O meio contendo somente glicose e cloreto de amônio foi chamado de meio simples e o meio similar ao de Badia-Fabregat (2013) é chamado de meio completo.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo completo.

Componente	Concentração
Glicose g·l ⁻¹	8
Cloreto de amônio g·l ⁻¹	1,9
Macronutrientes ml·l ⁻¹	10
micronutrientes ml·l ⁻¹	1

Tabela 2 - Composição de macronutrientes e micronutrientes.

Micronutrientes	Concentração (g·L ⁻¹)	Macronutrientes	Concentração (g·L ⁻¹)
Ácido triacético nitrila	1,5	KH ₂ PO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,5	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1
NaCl	1,0		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1		
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,2		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01		
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,01		
H ₃ BO ₃	0,01		
Na ₂ MoO ₄	0,01		

Neste estudo os experimentos foram realizados em triplicata, em frascos protegidos da luz (Erlenmeyer 125 mL, coberto com papel alumínio), fechados com tampão de algodão, contendo 30 mL de meio de cultivo.

Cada condição possuiu um branco com adição de benzofenona-3, sem fungo e em triplicata, utilizada para verificar a fotodegradação. Nesse estudo o inóculo foi de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A concentração inicial de fotoprotetor foi de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

O cultivo foi feito por 7 dias (BADIA-FABREGAT et al., 2012; GAGO-FERRERA et al., 2012a), com frascos mantidos sob condição estática (estufa) e agitada (agitador orbital, 120 rpm, $r = 25 \text{ mm}$), em 28°C . Ao finalizar o experimento a biomassa foi separada do meio utilizando uma espátula e destinada à análise de adsorção de BP-3 no micélio, conforme descrito na seção 4.6.2. A amostra líquida foi filtrada a vácuo com membrana de borosilicato, centrifugada por 15 min a 6.240 g (BADIA-FABREGAT et al., 2012) e adicionada em frasco âmbar, para análise em UV-Vis (287 nm), utilizando cubeta de quartzo (10 mm)(seção 4.6.1.1). Na sequência a amostra foi armazenada em freezer (-20°C).

4.4 Estudo 2 – Otimização da biodegradação da BP-3

Foi avaliado o cultivo no meio completo (descritos no item 4.3), adicionando ou não 0,1% do tensoativo Tween 80 (SPIER, 2005), com intuito de ajudar a solubilizar a benzofenona-3 no meio e/ou solução de CuSO_4 1 mM (SOUZA, 2013).

Além desse meio a degradação de BP-3 também foi avaliada em um meio de cultivo indutor de lacase, no qual há grande produção dessa enzima por *Trametes* sp. (BONATO, 2018; MATEI, 2018; RIEDI, 2019). O meio indutor de lacase é composto por: glicose ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); peptona 0,5%; MnSO_4 (1 mM); CuSO_4 (1 mM); FeSO_4 (1 mM); ZnSO_4 (1 mM); MgSO_4 (1 mM). Nesse caso como o meio já tinha adição de solução de sulfato de cobre só foi avaliada se a adição (ou não) de 0,1% tween 80 afetava a biodegradação da BP-3.

Os pellets foram adicionados ao estudo na concentração de 5 g de matéria seca por litro (BADIAFABREGAT et al., 2012).

A concentração inicial de benzofenona-3 foi de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BADIAFABREGAT et al., 2012; GAGO-FERRERA et al., 2012a; BADIA-FABREGAT, 2013). Os frascos

foram protegidos da luz (Erlenmeyer 125 mL, coberto com papel alumínio) e fechados com tampão de algodão, contendo 30 mL de meio de cultivo.

Este estudo foi conduzido em duplicata por 12 dias, com frascos mantidos sob condição estática (estufa) em 28°C. Ao finalizar o experimento seguiu-se o procedimento descrito nos itens 4.6.1 e 4.6.2 para análise de quantificação de BP-3.

4.5 Estudo 3 – Acompanhamento da cinética de biodegradação da BP-3

A cinética foi realizada nas melhores condições de degradação resultantes do estudo 2. O experimento foi conduzido durante 12 dias em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL do meio indutor de lacase, mantidos sob condição estática, a 28°C, em duplicata. Como inóculo foram utilizados pellets (5 g L⁻¹ em peso seco), obtidos conforme descrito em 4.1.2. As amostragens foram feitas a cada três dias retirando um frasco de cada condição do experimento. Ao serem coletadas as amostras, a biomassa de cada frasco foi separada do líquido e as seguintes análises foram efetuadas: concentração da benzofenona-3 no líquido (item 4.6.1), adsorção de BP-3 na biomassa (item 4.6.2), determinação de açúcares redutores (item 4.6.3) e quantificação da lacase (item 4.6.4).

4.6 Análises

Para a realização das análises a biomassa foi separada do meio de cultivo em duas etapas: a primeira através de retenção simples usando uma espátula, sendo essa a biomassa utilizada nos estudos de adsorção de BP-3 no micélio (seção 4.6.2); a segunda através da filtração do meio em membrana de borossilicato, sendo o filtrado centrifugado por 15 min a 6.240 g (BADIA-FABREGAT et al., 2012) e utilizado nas análises de quantificação da BP-3 (seção 4.6.1), de açúcares redutores (seção 4.6.3) e de lacase (seção 4.6.4).

4.6.1 Quantificação da BP-3 no meio

Nos meios de cultivo simples e completo – Tabela 2 e 3, a quantificação de BP-3 pode ser feita por espectrofotometria UV-Vis (Shimadzu), em 287 nm (DUTRA, 2002 - seção 4.6.1.1). Nos estudos com o meio indutor de lacase a quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE - seção 4.6.1.2). Essa diferenciação foi necessária porque o meio indutor de lacase, continha substâncias complexas na sua composição (extrato de peptona, por exemplo) e essas apresentavam interferentes no comprimento de onda de 287 nm, impossibilitando a quantificação da BP-3 por espectrofotometria.

4.6.1.1 Espectrofotometria

A curva de calibração foi estabelecida usando espectrofotometria em absorção no ultravioleta (Shimadzu, 287 nm) conforme DUTRA (2002). Alíquotas da solução estoque de BP-3 (1 g L^{-1}) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, sendo o volume completado com o meio, obtendo-se as curvas com concentrações de $0,5$ a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 8) de 1 a $12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 9) e de 10 a $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BP-3 (Figura 10).

Figura 9 – Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de $0,5$ a $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287 \text{ nm}$).

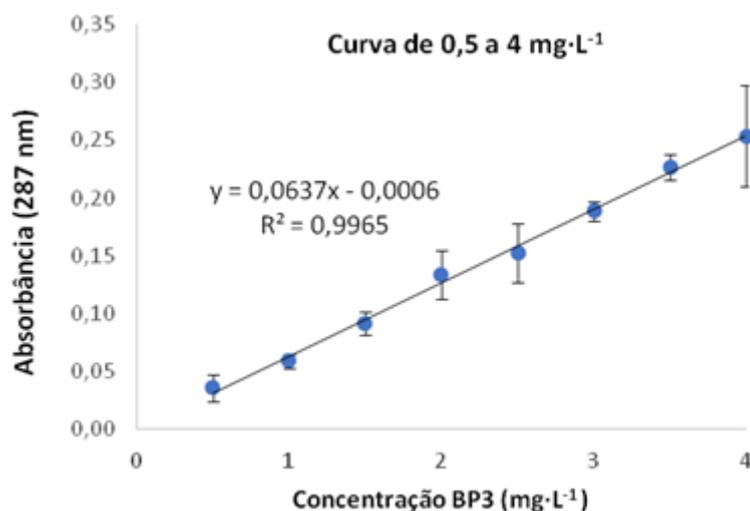


Figura 10 - Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de 1 a 12 mg·L⁻¹ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287$ nm).

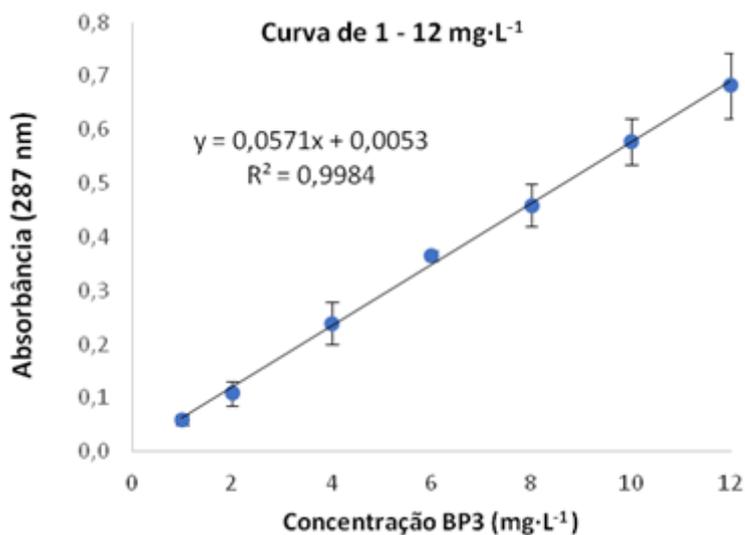
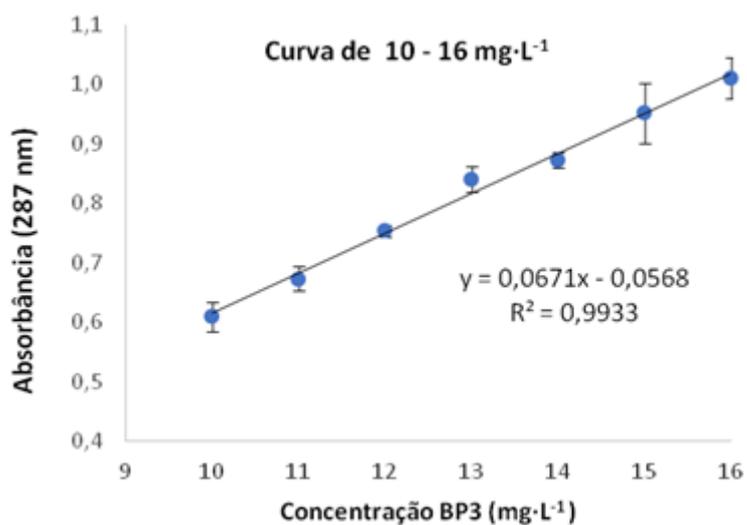


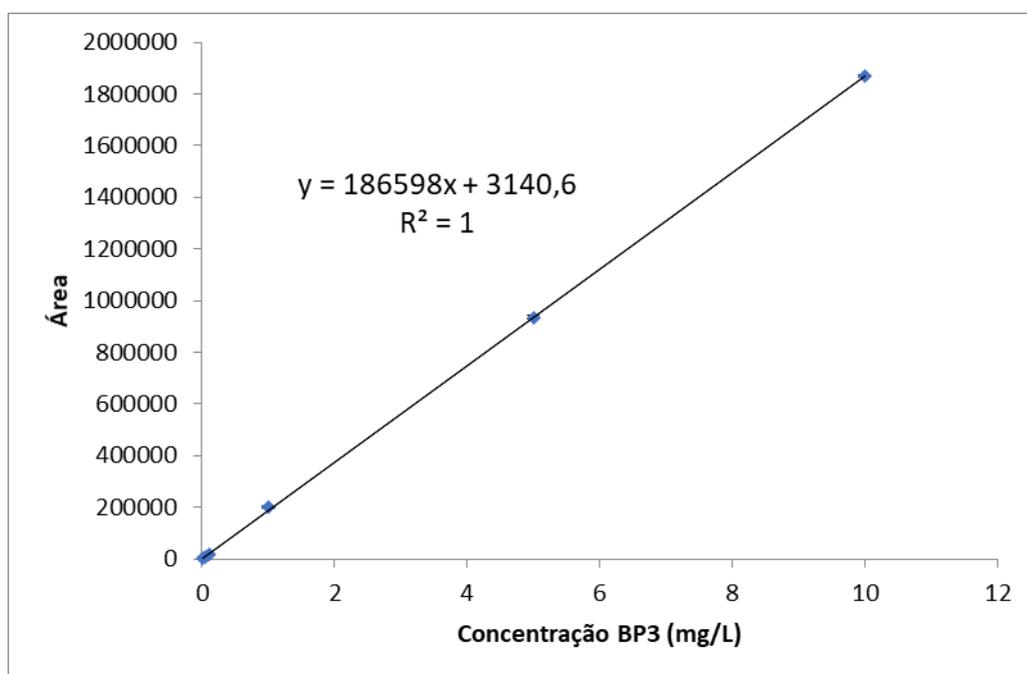
Figura 11 – Curva Padrão da Benzofenona -3 contendo concentrações de 10 a 16 mg·L⁻¹ analisada por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda = 287$ nm).



4.6.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para a reta de calibração da BP3 em CLAE foi realizada a diluição seriada da solução estoque de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de BP-3, como fase móvel foi utilizado acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% (70:30), coluna Luna hexil fenil, vazão de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, volume injetado de $50 \mu\text{l}$, durante 20 minutos a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir das médias foi obtida a reta de calibração plotada na Figura 12.

Figura 12 - Reta de calibração da BP3 em CLAE



4.6.2 Quantificação da BP-3 adsorvida no micélio

A biomassa foi separada do meio de cultivo com auxílio de uma espátula e foi transferida para frasco âmbar e colocada em um ultrafreezer (-80°C) por 24 h. Na sequência estas amostras foram liofilizadas (liofilizador LIOTOP - L101) a 57°C com uma pressão de vácuo inferior a 20 um, durante 48 h. Ao término da liofilização as amostras foram pesadas em balança analítica e armazenadas em freezer (-20°C).

Uma parte da biomassa liofilizada foi macerada (em placa de Petri, usando bisturi) e transferida para um microtubo de 2,0 mL, no qual adicionou-se 1 mL de etanol (1:1 v/v). O rompimento micelial foi realizado utilizando um dispersor ultraturrax, na velocidade 3 e 4, com ciclos de 30 segundos de agitação e 30 segundos de resfriamento em banho de gelo, em um total de 3 a 5 ciclos, para completa suspensão da biomassa. Na sequência essa suspensão foi centrifugada por 15 min a 6.240 g, sendo que o sobrenadante era recolhido em balão volumétrico de 10 mL e a biomassa era ressuspensa com nova adição de etanol (1:1 v/v). Essa operação foi repetida por três vezes, e no final o volume do balão foi completado com etanol (1:1 v/v) (BADIA-FABREGAT et al., 2012). A amostra foi analisada por espectrofotometria de UV-VIS (seção 4.9.1.1). A massa de BP-3 adsorvida no micélio foi calculada segundo a Equação 1.

$$BP - 3_{ads} = \frac{BP - 3_{sob} \cdot V_{Liq}}{Bio_{Est}} \cdot Bio_{Tot} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo,

$BP - 3_{ads}$ = massa de BP-3 adsorvida no micélio (mg)

$BP - 3_{sob}$ = concentração de BP-3 no sobrenadante ($mg \cdot L^{-1}$)

V_{Liq} = volume do sobrenadante ajustado no balão volumétrico (L)

Bio_{Est} = massa de micélio utilizada no estudo (mg)

Bio_{Tot} = massa total de micélio pesada após a liofilização (mg)

Conhecendo a massa de BP-3 adicionada no frasco no início do experimento e determinando a massa adsorvida no micélio, pode-se calcular tanto a remoção por adsorção (%), quanto a concentração de BP-3 que ficou disponível para a biodegradação, conforme a Equação 2.

$$BP - 3_{Liq} = \frac{BP - 3_{ini} - BP - 3_{ads}}{V_{meio}} \quad \text{Equação 2}$$

Em que,

$BP - 3_{Liq}$ = concentração de BP-3 no líquido, disponível para biodegradação ($mg \cdot L^{-1}$)

$BP - 3_{ini}$ = massa de BP-3 no início do experimento (mg)

$BP-3_{ads}$ = massa de BP-3 adsorvida no micélio (mg)

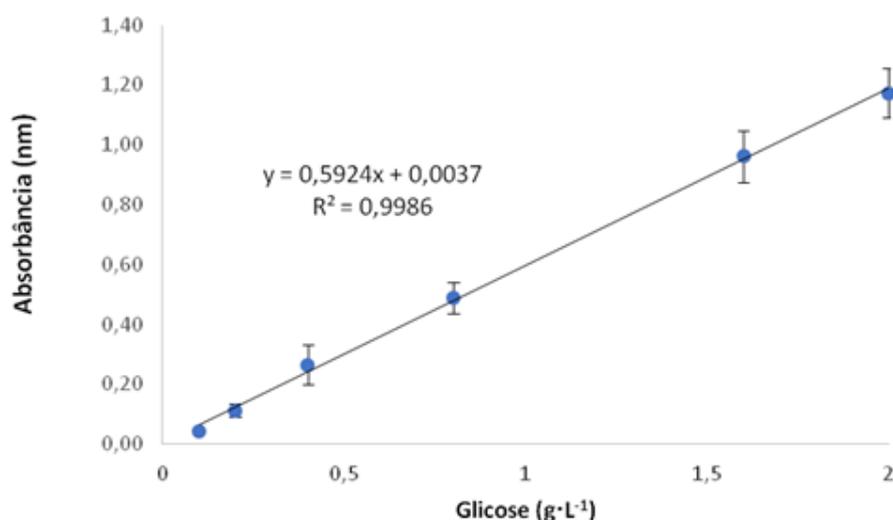
V_{meio} = volume do meio de cultivo usado no experimento (L)

Conhecendo a concentração de BP-3 disponível para a biodegradação e seu valor ao final do experimento, pode-se calcular a remoção por biodegradação (%).

4.6.3 Determinação de açúcares redutores

Para a realizar a quantificação de açúcares redutores presentes no meio de cultivo foi utilizado o método colorimétrico tendo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante (MILLER, 1959). A curva analítica padrão (Figura 13), foi preparada pesando 0,2 g de glicose e dissolvendo em 100 mL de água destilada, para obtenção de uma solução de 2 g·L⁻¹. Foi transferido para tubos de ensaio volumes (mL) de: 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0 da solução de glicose e acrescentou-se água destilada a cada tubo de ensaio respectivamente (mL): 1,4, 1,3, 1,1, 0,7 e 0,5. Todos os tubos receberam 1,0 mL do reativo DNS, e foram aquecidos em banho-maria por 5 min. Após serem resfriados cada tubo recebeu, 7,5 mL de água destilada. Para que as amostras pudessem ser analisadas em espectrofotômetro a 540 nm, foram feitas diluições, onde 1 ml das amostras, foi transferido para balões volumétricos de 10 ml e o volume foi completado com água. O experimento foi realizado em triplicata (LUCIA, 2007).

Figura 13 - Curva padrão da Glicose pela técnica de DNS



4.6.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da lacase foi determinada através da oxidação do 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico), também chamado de ABTS.

Este procedimento foi dividido em duas partes, na primeira foi adicionado 1,7 ml de solução tampão de acetato de sódio 50 mmol (pH 5) e 0,2 ml de ABTS a um tubo de ensaio.

Na segunda parte, em um tubo de ensaio a parte preparei a diluição da amostra, adicionando 10 μ L de amostra em 299 μ L da mesma solução tampão de acetato de sódio usada anteriormente. Esta solução foi adicionada a primeira e foi aquecida em banho maria a 40 °C por 5 minutos. Após isso a solução foi analisada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 420 nm (PATEL et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo 1 – Degradação de benzofenona-3 por *Trametes* sp.

Neste estudo o objetivo foi avaliar a condição que mais contribuiu com a degradação da benzofenona-3 nos cultivos. Foram variadas as condições como o tipo de inóculo (pellet ou plugue), o tipo de cultivo (estático - estufa ou agitado - 120 rpm) e o meio de cultivo (mais completo ou mais simples). O resultado desta análise consta na tabela 3.

Tabela 3 - Remoção da benzofenona-3 por *Trametes* sp. após 7 dias, em 28°C com concentração inicial de filtro solar de 10 mg·L⁻¹ (n=3)

Agitação	Inoculo	Meio de Cultivo	BP-3 Biodegradação (%)		Adsorção (%)		Remoção Total (%)	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP
Com	Pellet	MC	25,7	11,2	10,6	8,3	36,3	4,9
		MS	24,3	3,2	15,2	4,4	39,4	3,2
Sem	Pellet	MC	20,3	10,1	12,0	4,3	32,4	5,0
		MS	20,8	10,0	14,5	4,8	35,3	7,0
	Plugue	MC	13,6	3,9	16,3	1,7	29,8	3,7
		MS	18,3	8,2	14,1	4,6	32,4	8,4

MC – Meio Completo

MS – Meio Simples

Foi possível observar em torno de 15% de adsorção em todas as condições. Seguindo a mesma metodologia, BADIA-FABREGAT et al. (2012), GAGO - FERRERA et al. (2012a), BADIA - FABREGAT (2013) obteve 19,6% de adsorção utilizando uma técnica diferente (inativação do inóculo com autoclave por 30 minutos a 121°C no início do experimento, para avaliar a adsorção do contaminante pela biomassa) sendo a remoção de benzofenona-3 de quase 100% em 24 horas. Pode-se dizer com este resultado que a BP-3 pode ser removida pela biodegradação e não só pela adsorção.

Não é possível observar diferença significativa nas remoções totais. Sendo o meio completo mais rico em nutrientes para o crescimento microbiano do que o meio simples, este será utilizado novamente no segundo estudo.

O inóculo pellet possui um micélio com espaços vazios e poros entre as hifas miceliais, sendo, portanto, capaz de influenciar positivamente na adsorção, pois pode aumentar a superfície de contato da biomassa com a molécula do fotoprotetor. Neste estudo além do inóculo pellet ter apresentado uma adsorção efetiva ele facilita as análises de adsorção, sendo assim este inóculo seguirá no estudo.

Na pesquisa da BADIA-FABREGAT e colaboradores (2014) foram obtidas taxas de biodegradação de 100% para o cultivo utilizando $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de biomassa fúngica, em frascos contendo BP3 a concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Neste estudo a concentração da biomassa foi de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, podendo este item ter sido decisivo na quantificação da remoção do fotoprotetor, portanto, a taxa de inoculação será alterada e aumentada para $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.1.1 Quantificação do consumo de glicose

Os resultados obtidos para a quantificação de glicose durante o experimento estão mencionados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultado do consumo de glicose em 7 dias por *Trametes* sp. (n=2)

Meio Completo		Consumo de glicose (%)
Agitação	Inoculo	
Com	Pellet	70,2
Sem	Pellet	85,2
Sem	Plugue	79,0
Meio Simples		
Com	Pellet	59,0
Sem	Pellet	61,3
Sem	Plugue	58,7

Os fungos inoculados consumiram a glicose presente nos meios, portanto existiu crescimento fúngico.

É possível observar que no meio completo o consumo foi maior chegando a 85,2%.

5.2 Estudo 2 – Otimização da biodegradação da BP-3

Foi avaliado no meio completo e no meio indutor de lacase, a degradação de BP-3 adicionando ou não 0,1% Tween 80 (SPIER, 2005) e/ou solução de CuSO_4 1 mM (SOUZA, 2013). As condições foram estáticas, com inoculo pellet $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Os dados obtidos estão na tabela 5.

Tabela 5 - Remoção da benzofenona-3 com *Trametes* sp. após 12 dias, em 28°C com concentração inicial de filtro solar de $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. (n=2)

Meio de Cultivo	BP-3 Biodegradada (%)		Remoção Adsorção (%)		Remoção Total (%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
MC	11,8	2,1	19,2	0,4	31,0	2,4
MC+T	13,5	0,6	24,2	0,3	37,6	0,3
MC+ CuSO_4	13,5	0,7	17,9	0,2	31,4	0,6
MC+T+ CuSO_4	10,4	3,4	20,4	0,0	30,8	3,4
ML	60,5		37,1	0,0	97,6	
ML+T	43,8		54,3	0,7	97,6	

MC - Meio Completo; T – Com adição de Tween; CuSO_4 – Com adição de Sulfato de Cobre; ML – Meio indutor de lacase.

Analisando estes dados é possível observar que a remoção foi praticamente igual à do primeiro estudo, mesmo com o aumento da biomassa, isso não era esperado pois quanto maior a quantidade de biomassa no meio maior é o contato do fotoprotetor com o fungo, sendo assim sua remoção deveria ser maior.

O tensoativo Tween 80 aumentou a adsorção no micélio nos meios em que foi adicionado, chegando a 54,3% no meio indutor de lacase e 24,2% no meio completo. Este composto tem como principal função diminuir a tensão superficial, desta forma ajuda a solubilizar a benzofenona-3 fazendo com que ela seja adsorvida mais facilmente.

A adição de mais Sulfato de Cobre nos meios não influenciou no aumento das taxas de remoção, biodegradação e adsorção nos meios deste estudo mostrando que o sulfato de cobre não foi um indutor eficiente.

Esta pesquisa teve duração de 12 dias e foi possível obter em torno de 33% de remoção da benzofenona-3 utilizando meio completo, um estudo com um período de duração maior pode resultar em uma porcentagem mais efetiva de degradação.

O meio indutor de lacase se mostrou muito eficiente na degradação do fotoprotetor apresentando bons resultados com uma remoção de 97% da BP3. A Biodegradação e a adsorção foram altas sendo que no meio com adição de tween houve maior adsorção.

Segundo RIEDI (2019), a presença de metais pesados como Zn^{2+} e Mg^{2+} , em concentrações de 1mM, demonstra ser capaz de aumentar a produção de lacases em *Trametes* sp.

A presença de íons como Fe^{2+} e Cu^{2+} aumentam os níveis de transcrição gênica de *lac5930-1*, um gene identificado como responsável pela produção de lacases em *Trametes velutina* (5930). Fungos expostos ao meio de cultivo com a presença de 0,02 mM Fe^{2+} obtiveram 4,5 vezes mais produção de lacase do que aqueles não expostos (Yang et al., 2013).

Para realizar o terceiro estudo (cinética de degradação da benzofenona-3) foi escolhido o meio indutor de lacase por ter apresentado maior degradação.

5.2.1 Quantificações do consumo de glicose pelos fungos

Neste estudo houve consumo de glicose, indicando crescimento fúngico (Tabela 6). O consumo de glicose foi maior no meio indutor de lacase onde a benzofenona-3 teve maior remoção.

Tabela 6 - Resultado do consumo de glicose em 12 dias por *Trametes* sp. no estudo 2. (n=2)

Identificação	Média do consumo de glicose (%)
MC	58,6
MC+T	31,3
MC+CuSO ₄	55,5
MC+T+CuSO ₄	48,2
ML	61,2
ML+T	68,3

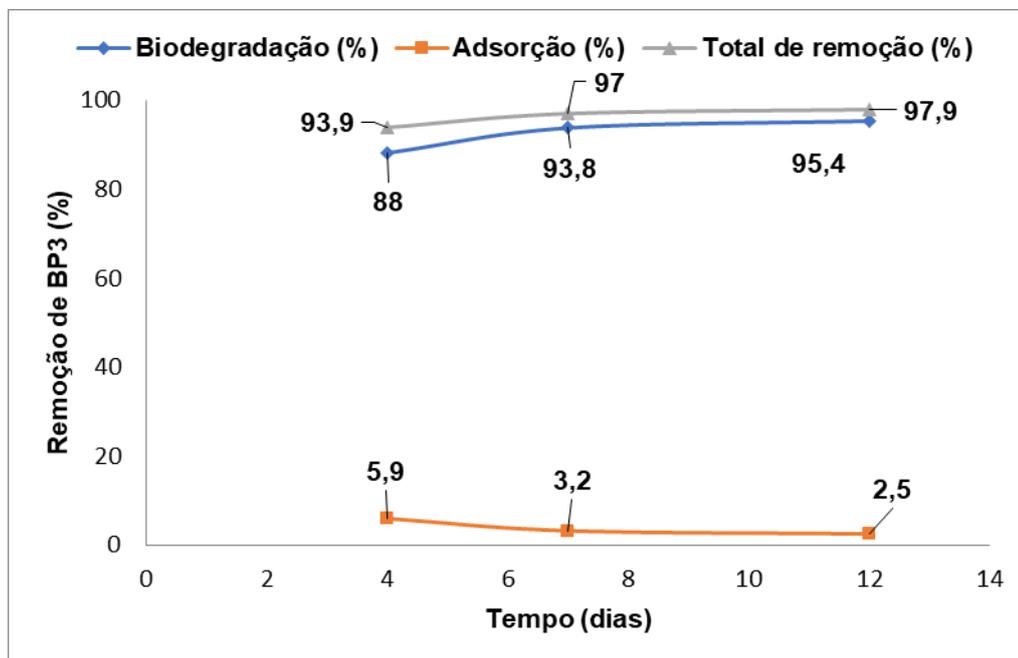
MC - Meio Completo; T – Com adição de Tween; CuSO₄ – Com adição de Sulfato de Cobre; ML – Meio indutor de lacase.

Analisando o consumo de glicose para o meio completo e comparando este com o primeiro estudo, não houve aumento, para averiguar esta situação se faz necessária outras pesquisas, como por exemplo a realização deste experimento novamente para averiguar, se de fato, o consumo da glicose permanece baixo.

5.3 Estudo 3 – Acompanhamento da cinética de biodegradação da BP-3

Este estudo teve duração de 12 dias, no acompanhamento do processo foi observado que já no quarto dia o fungo havia degradado 88% de BP3, e entre o quarto e o décimo segundo dia houve somente 7% de remoção da BP3 (Figura 14). Isso mostra que a degradação da BP3 foi bastante efetiva desde o início do estudo, e que deveriam ter sido feitas coletas mais frequentes (diárias) das amostras.

Figura 13 - Relação da remoção de benzofenona-3 por adsorção e biodegradação.



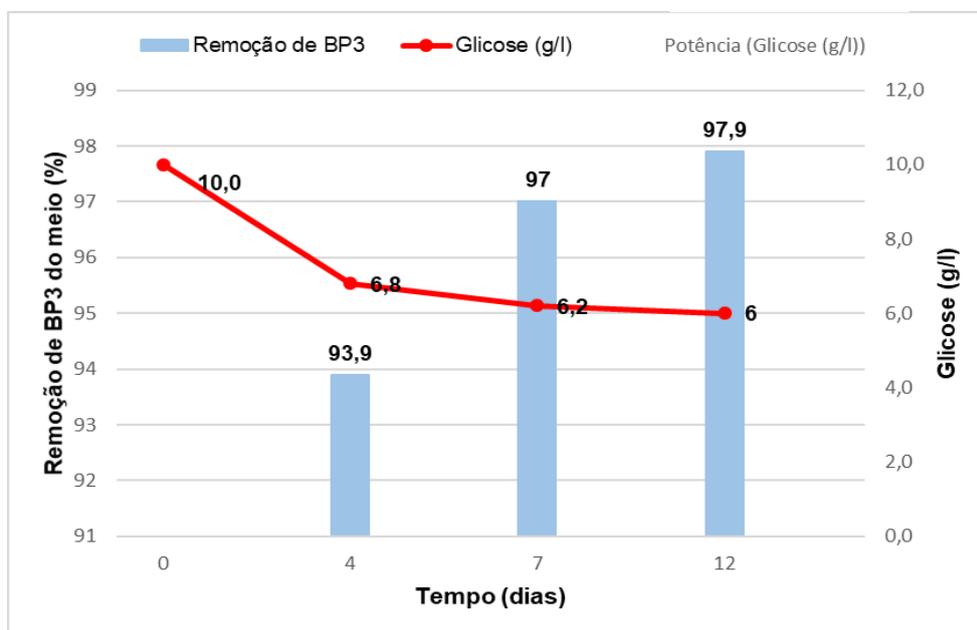
É possível observar que a adsorção diminui enquanto a biodegradação aumenta. A diminuição por adsorção pode ter ocorrido pela benzofenona-3 estar sendo dessorvida e consumida pelo fungo.

No trabalho de GAGO - FERRERA et al. (2012a), foi realizado um experimento de 20 dias para avaliar o tempo de remoção da BP-3 em concentração de 250 µg·l. O resultado da biodegradação foi completo entre o 10º e o 15º dia.

Se este estudo permanecesse por um período maior, poderíamos obter a eliminação total do contaminante.

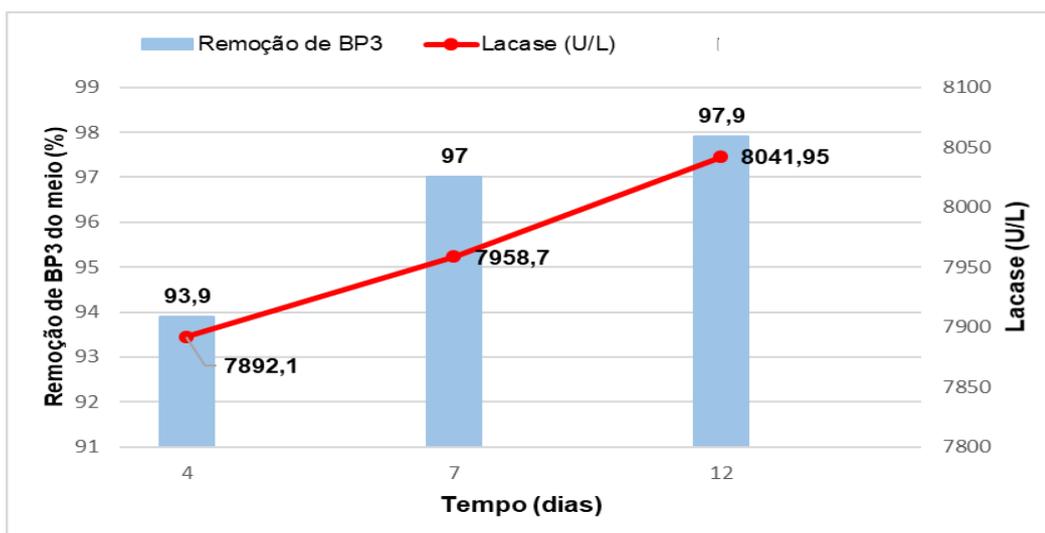
Com intuito de analisar a relação de glicose com a biodegradação das amostras foram feitas análises do açúcar redutor nos meios. Nos primeiros dias tanto a glicose quanto a BP-3 foram bastante consumidas, indicando ser possível correlacionar o consumo de glicose com a remoção de BP-3 (Figura15). O fungo utiliza a glicose como fonte de energia, ou seja, a diminuição da glicose ao decorrer do experimento possui relação com a atividade fúngica.

Figura 14 - Gráfico correlacionando a remoção de BP3 (%) com consumo de glicose ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).



Para realizar a quantificação de lacase no meio a amostra foi diluída em uma proporção 1:300 e analisada por espectrofotometria. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 16.

Figura 15 – Gráficos correlacionando a remoção de BP3 com a produção de lacase.



Analisando este gráfico é possível afirmar que utilizando o fungo *Trametes* sp. no meio utilizado, mostrou ser um bom produtor de lacase (sendo possível obter acima de 8000 U L^{-1}), este é um resultado bom, pois as lacases são oxiredutases e catalisam a oxidação de diversos compostos.

Houve grande produção de Lacase até o quarto dia e deste dia até o decimo segundo não houve diferença significativa na quantidade de lacase produzida. O aumento da produção desta enzima na presença de metais como FeSO_4 , ZnSO_4 e MgSO_4 , mostra a habilidade desses íons em estimular sua formação, provavelmente devido a uma resposta de defesa a estresses ambientais em que ocorre a síntese de pigmentos para evitar a absorção desses metais como xenobióticos (RIEDI, 2018).

Com esta pesquisa foi possível concluir que a remoção da benzofenona-3 pode ser feita através de degradação fúngica.

6 CONCLUSÃO

No primeiro estudo não houve diferença significativa na remoção total. No meio simples era esperado uma degradação menor por este possuir menos nutrientes, no entanto a degradação foi semelhante à do meio completo. Neste estudo, utilizando o meio completo o consumo de glicose foi maior.

No segundo estudo a remoção foi praticamente igual ao primeiro, mesmo com aumento da biomassa. O Tween aumentou a adsorção pois ajudou a solubilizar a BP3. A adição de Sulfato de Cobre não mostrou diferença significativa. O meio indutor de Lacase forneceu resultados diferentes e muito efetivos por ser um meio com muitos nutrientes, desenvolvido para induzir a produção de lacase. O tween apresentou diferença na adsorção novamente neste meio. Neste estudo o maior consumo de glicose foi no meio com mais BP3 degradada.

No terceiro estudo, já no quarto dia o fungo apresentou altas taxas de remoção. A remoção por adsorção diminuiu no decorrer do trabalho, podendo esta estar sendo dessorvida e consumida pelo fungo. O fungo *Trametes* sp. mostrou ser um bom produtor de lacase, tendo aumento em sua produção enzimática com a utilização do meio rico em metais. Houve grande produção de Lacase até o quarto dia e deste dia até o decimo segundo não houve diferença significativa na quantidade de lacase produzida.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHO FUTUROS

- Realizar estudo da cinética no indutor de lacase e no meio completo em um período maior (22 dias) para determinar o tempo de remoção completa da BP-3;
- Realizar a Biodegradação enzimática da Benzofenona-3

REFERÊNCIAS

Avobenzona. Disponível em:

<http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/6209-0d3f1060a4ef48d312d1cd2e8abacd54ea246a8c/main/files/Parsol%201789_022302a_PT.pdf> acesso em: 17 jun. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - Farmacopeia Brasileira **Resolução RDC nº. 49, de 23 de novembro de 2010** Aprova a Farmacopeia Brasileira. 2010.

BADIA - FABREGAT, M. Study of relevant factors in the treatment of effluents by fungi for the degradation of emerging contaminants. 2013 PhD Tese (doutorado em Engenharia Química) – **Escola de Engenharia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra**, 2013.

BADIA - FABREGAT, M. GAGO-FERRERO, P.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; VICENT, T.; CAMINAL, G.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D.; Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Environmental Management**, v. 104, p. 114-120, 2012.

BADIA-FABREGAT M.; CAMINAL G.; VICENT T.; BLANQUEZ P.; GAGO-FERRERO P.; OLIVARES A.; PINA A.; DIAZ-CRUZ M. S.; BARCELO D.; UV Filters Biodegradation by Fungi, Metabolites Identification and Biological Activity Assessment - **Escola de Engenharia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra**, 2017.

BALOGH, T. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **An. Bras. Dermatol.**, Ago 2011, vol.86, no.4, p.732742.

BONATO C. H. Aline; A. B. Ianoski; M. V. Liz; G. M. Maciel et al. Biodegradação de sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *trametes sp.* in: **II congresso paranaense de microbiologia - simpósio sul-**

americano de microbiologia ambiental, 2016. anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/cpm/papers/biodegradacao-de-sulfametoxazol-e-trimetoprima-por-enzimas-ligninoliticas-produzidas-pelo-fungo-trametes-sp.->> Acesso em: 04 jul. 2019.

CHISVERT, A. SALVADOR, A. UV filters in sunscreens and other cosmetics. Tanning and whitening agents. Analytical methods. **Analysis of cosmetic products**. C. 3, p. 83-120,2007.

COLLINS, P.J., DOBSON, A.D.W., 1997. Regulação da Transcrição do Gene Laccase em *Trametes versicolor*. **Appl. Environ Microbiol.** 63, 3444-3450.

CRISTA, D. Degradação dos filtros UV 4-terc-butil-4'- metoxidibenzoilmetano e 2etilhexil-4- metoxicinamato em águas cloradas. 2012. **Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal.**

DÍAZ-CRUZ, M. S.; GAGO-FERRERO, P.; LLORCA, M.; BARCELÓ, D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 7, p. 2325-2333, 2012.

DÍAZ-CRUZ, M. S. BARCELÓ, D. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 708-717, 2009.

DÍAZ-CRUZ, S., LIORCA, M., BARCELÓ, D.; 2008; Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment; **Trends Anal. Chem.**; 27 (10); 873,887.

FENT, K.; ZENKER, A. RAPP, M.; Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1817-1824, 2010.

FLOR, J; DAVOLOS M; CORREA, M. Protetores solares. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 153-158, Feb. 2007

FONT, X.; CAMINAL, G.; GABARRELL, X.; ROMERO, S.; VICENT, M. T. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p. 548-554, 2003.

GAGO-FERRERO, P.; ALONSO, M. B.; BERTOZZI, C. P.; MARIGO, J.; BARBOSA, L.; CREMER, M.; SECCHI, E.R.; AZEVEDO, A.; LAILSON-BRITO, J.Jr.; TORRES, J. P. M.; MALM, O.; ELJARRAT, E. DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 5619-5625, 2013.

GAGO-FERRERO, P.; DÍAZ-CRUZ, M.; BARCELÓ, D. An overview of UV absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2597–2610, 2012.

GAGO-FERRERO, P.; FABREGAT-BADIA, M.; OLIVARES, A.; PIÑA, B.; BLÁNQUEZ, P.; VICENT, T.; CAMINAL, G.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Evaluation of fungal and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP1. **Science of the Total Environment**, v. 427-428, p. 355-363, 2012a

GIOKAS, D.L., SAKKAS, V.A., ALBANIS, T.A.; 2004; Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry; **J. Chromatogr. A**; 1026 (1e2); 289,293.

GRANGER, K.LEE and BROWN, P.R.; 2001; The Chemistry and HPLC Analysis of Chemical Sunscreen Filters in Sunscreens and Cosmetics; **J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.**; 24:19; 2895-2924.

HADIBARATA, T. et al. Degradation and transformation of anthracene by white-rot fungus *armillaria* sp. f022. **Folia microbiologica**, v. 58, 01 2013.

HUONG, S.P., ROCHER, E., FOURNERON, J.-D., CHARLES, L., MONNIER, V., BUND, H., ANDRIEU, V.; 2008; Photoreactivity of the sunscreen butylmethoxydibenzoylmethane (DBM) under various experimental conditions; **J. Photochem. Photobiol A**; 196 (1); 106,112.

KIM, S.; CHOI, K. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. **Environment International**, v. 70, p. 143–157, 2014.

KIM, B.; KWON, B.; JANG, S.; KIM, P.G.; JI, K. Major benzophenone concentrations and influence of food consumption among the general population in Korea, and the association with oxidative stress biomarker. **Science of the Total Environment**, v. 565, 649-655, 2016.

LEISOLA, M.; PASTINEN, O.; AXE, D. D. Lignin—Designed Randomness. **BioComplexity**, v.2012, n. 3, p- 1-11. 2012.

LAMBROPOULOU, D.A., GIOKAS, D.L., SAKKAS, V.A., ALBANIS, T.A., KARAYANNIS, M.I.; 2002; Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-paminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid phase microextraction; **J. Chromatogr.; A**; 967 (2); 243,253.

LOUIS, G. M. B.; KANNAN, K.; SAPRA, K. J.; MAISOG, J.; SUNDARAM, R. Urinary concentrations of benzophenone-type ultraviolet radiation filters and couples' fecundity. **American Journal of Epidemiology**, v. 180 n.12 p. 1168-1175, 2014.

LUCCA, Suelly Madaleine Santos de. **Avaliação da degradação da benzofenona-3 por *Pleurotus ostreatus***. Trabalho de Conclusão de Curso. Tecnologia em Processos Ambientais. Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

LUCIA, C. **Bioquímica: Aulas práticas. 7. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná**, 2007. 146 p., 21,00 x 15,00 x 1,00 cm. ISBN 85-7335-037-7.

MATEI, J. C. Pré-tratamento biológico de resíduos agroindustriais por enzimas ligninolíticas para produção de bioetanol. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018**

MOREIRA, J.; GONÇALVES, E; BERETTA, M. Contaminantes Emergentes. (**RQI**) **Revista de Química Industrial**, São Luiz. nº 738, Pág. 4-13.1º trimestre de 2013.

NASCIMENTO, L.; SANTOS, E; AGUIAR, A. Fotoprotetores Orgânicos: Pesquisa, Inovação e a Importância da Síntese Orgânica. **Rev. Virtual Quim.**, 2014, volume 6, número 2, Pág 190-223

NETO, Bento Pereira da Costa. Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas. 2009. 124p. **Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.**

PAESE, K. Desenvolvimento tecnológico, estudo da Fotoestabilidade e Avaliação da Permeação Cutânea in vitro da Benzofenona-3 a partir de Nanocápsulas Poliméricas Incorporadas em Diferentes Veículos Semi-sólidos. 2008. 213p. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2008.**

PARK, C. et al. Single- and mixture toxicity of three organic UV-filters, ethylhexyl methoxycinnamate, octocrylene, and avobenzene on *Daphnia magna* Saarbrücken, Germany. **Ecotoxicology and Environmental Safety, ScienceDirect** Vol: 137, 2017. Page: 57-63

PIRES, O.A.B. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos de fungos da podridão branca como pré-tratamento para sacarificação de resíduos agrícolas.** 2015. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (bachelorado em Química Tecnológica) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

POMPEI, C.M.E. Filtros ecológicos: um estudo de remoção de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais e do efeito de contaminação no biofilme. 2016. 788 f. **Tese (doutorado em Ciências de Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade São Paulo, São Carlos, 2016.**

RAMOS, S.; HOMEM, V.; ALVES, A.; SANTOS, L.; A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. **Science Direct**. Porto, Portugal, 2016. p. 24–44.

RIEDI P. H.; Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida. **Dissertação (Pós graduação) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba 2019.**

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ CE, CAMINAL G, VICENT T, DIAZ-CRUZ MS, ELJARRAT E, FARRE M, LOPEZ DE ALDA MJ, PETROVIC M, BARCELO D (2012) Fungal-mediated degradation of emerging pollutants in sewage sludge. **Hdb Env Chem. doi 10.1007/698_2012_159**

ROGGIA, I.; FERRONY, D.; ALVES, M. P.; LAPORTA, L. V.; FRIEDRICH, M.; SANTOS, M. R.; RUBIM, A.; PEIXOTO, S. C.; PAESE, K. Validação de metodologia analítica para a determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v.35, n. 2, p. 223-232, 2014

SANAD R. A.; MALAK-ABDEL, S.N.; BAYOOMY, T.S. et al.; BADAWI, A. A. Formulation of a Novel oxybenzone-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs). (NLCs). **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n.4, p.1684-1694, 2010

SÁNCHEZ-QUILES, D.; TOVAR-SÁNCHEZ, A. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? **Environment International**, 83, 158–170, 2015.

SANTOS, Vinícius Machado. Preparação de Filtros Solares em Nanosistema Visando à Maior Ação Protetora. 2007. 126p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SCHLUMPF, M.; SCHMID, P.; DURRER, S.; CONSCIENCE, M.; MAERKEL, K.; HENSELER, M.; GRUETTER, M.; HERZOG, I.; REOLON, S.; CECCATELLI, R.; FAASS, O.; STUTZ, E.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 113–22, 1 dez. 2004.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794-802, 2007.

SHAATH, N.A.; 2010; Ultraviolet filters; Photochem. Photobiol. **Sci.** 9 (4); 464, 469.

SILVA, C. Filtros UV na água de abastecimento público na região da bacia hidrográfica tietê-jacaré: desenvolvimento de método, estudo de ocorrência e concentrações ambientais. 2014. 125 f. **Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Instituto de Química de Araraquara, 2014.

SPIER, R. M. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. **Dissertação (PósGraduação) - Universidade Federal do Paraná**, 2005.

SOUSA, R. Caracterização e avaliação da fotoestabilidade do filtro solar butil metoxidibenzoilmetano (avobenzona) através de IV e RMN. **Dissertação (pósgraduação) - Universidade Federal de Goiás**, Instituto de Química, 2015.

SOUZA, A. V. D. S. B. Otimização da produção de lacase pelo fungo *Trametes sp.* para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso. 143 f. **Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) — Universidade Federal Do Paraná, Curitiba**, 2013.

SUZUKI, T.; KITAMURA, S.; KHOTA, R.; SUGIHARA, K.; FUJIMOTO, N.; OHTA, S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 9–17, 2005.

VIDAL, L., CHISVERT, A., CANALS, A., SALVADOR, A.; 2010; Ionic liquidbased single-drop microextraction followed by liquidchromatographyultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface waters; **Talanta**; 81 (1e2); 549,555.

VILA, M. et al. Determination of fourteen UV filters in bathing water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. Santiago de Compostela, Spain **Anal. Methods**, 2016. p 7069–7079.

YANG, Y. et al. Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot-fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological application by different metal ions and aromatic compounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p 1-9, 2013.

ZWIENER, C., RICHARDSON, S.D., De MARINI, D.M., GRUMMT, T., GLAUNER, T., FRIMMEL, F.H.; 2007; Drowning in disinfection byproducts? Assessing swimming pool water; **Environ. Sci. Technol.**; 41 (2); 363,372.